

**Métodos colorimétricos sob uso de reagentes sintéticos e alternativos para viabilidade
polínica de *Bixa orellana* L.**

**Colorimetric methods using synthetic and alternative reagents for pollen viability of
Bixa orellana L.**

**Métodos colorimétricos que utilizan reactivos sintéticos y alternativos para la viabilidad
del polen de *Bixa orellana* L.**

Recebido: 19/06/2020 | Revisado: 19/06/2020 | Aceito: 24/06/2020 | Publicado: 06/07/2020

Thatielen Furini

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3420-1639>

Universidade do Estado do Mato Grosso, Brasil

E-mail: thatyfurini2003@hotmail.com

Maicon de Souza Pecegheiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7223-3055>

Universidade do Estado do Mato Grosso, Brasil

E-mail: maiconpc1905@hotmail.com

Fernando Herrmann

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5207-6953>

Universidade do Estado do Mato Grosso, Brasil

E-mail: herrmann.fernando2016@gmail.com

Jean Carlos Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3023-5153>

Universidade do Estado do Mato Grosso, Brasil

E-mail: jean_carlos1985@hotmail.com

Joelson de Oliveira Barros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2348-8590>

Universidade do Estado do Mato Grosso, Brasil

E-mail: joel_bio10@hotmail.com

Samiele Camargo de Oliveira Domingues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7772-8310>

Universidade do Estado do Mato Grosso, Brasil

E-mail: samieledomingues@gmail.com

Isane Vera Karsburg

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9637-0449>

Universidade do Estado do Mato Grosso, Brasil

E-mail: isane9@gmail.com

Resumo

O estudo de viabilidade polínica é essencial para o melhoramento genético, pois evidencia a fertilidade das espécies. Assim, testes estimativos de grãos de pólen de *B. orellana* L., em viáveis e inviáveis, mostram-se necessários a fim de se buscar corantes eficientes, seguros e preferencialmente, acessíveis e de fácil manipulação para distinção do potencial reprodutivo dos gametas masculinos do urucum. Objetivou-se avaliar a potencialidade de cinco testes colorimétricos, três reagentes sintéticos e dois alternativos, com o intuito de estimar a viabilidade polínica da *B. orellana* L. Um mix de 50 botões florais em estágio de pré-antese foi coletado em diferentes localidades, no município de Alta Floresta - MT. Em laboratório, os grãos de pólen foram testados com três corantes sintéticos: Reagente de alexander, Lugol 2% e método de Roeser (Azul-de-astra + Fucsina); Mais dois naturais, extraídos da flor de papoula vermelha (*Hibisco* sp.) e da casca de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). A viabilidade polínica foi estimada pela percentagem de grãos de pólen viáveis e inviáveis. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, composto por 5 tratamentos e 10 repetições. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os corantes sintéticos Reagente de alexander e Lugol 2% obtiveram as maiores médias, no entanto, não diferiram pelo teste de média do corante alternativo de *Hibisco* sp. que demonstrou ser adequado e recomendável ao uso na citogenética pelo baixo custo, facilidade de aquisição e manuseio, tornando-se uma alternativa estratégica quando comparado aos corantes sintéticos convencionais.

Palavras-chave: Azul-de-astra; Fucsina; Lugol; Reagente de alexander; Urucum.

Abstract

The study of pollen viability is essential for genetic improvement, as it shows the fertility of species. Thus, estimates of pollen grains of *B. orellana* L., in viable and non-viable, are necessary in order to search for efficient, safe and preferably, accessible and easy-to-manipulate dyes to distinguish the reproductive potential of male gametes in the annatto. The objective was to evaluate the potential of five colorimetric tests, three synthetic and two

alternative reagents, in order to estimate the pollen viability of *B. orellana* L. A mix of 50 flower buds in the pre-anthesis stage was collected in different locations, in the municipality of Alta Floresta - MT. In the laboratory, the pollen grains were tested with three synthetic dyes: Alexander reagent, 2% Lugol and Roeser method (Astra blue + Fuchsin); Two more natural, extracted from the red poppy flower (*Hibisco* sp.) And from the Jatobá bark (*Hymenaea courbaril* L.). Pollen viability was estimated by the percentage of viable and non-viable pollen grains. A completely randomized design was used, consisting of 5 treatments and 10 repetitions. The data were submitted to the Tukey test at 5% probability. The synthetic dyes Reagent de alexander and Lugol 2% obtained the highest averages, however, they did not differ by the average test of the alternative dye of *Hibisco* sp. which proved to be suitable and recommended for use in cytogenetics due to its low cost, ease of acquisition and handling, making it a strategic alternative when compared to conventional synthetic dyes.

Keywords: Oyster blue; Fuchsin; Lugol; Alexander reactive; Annatto.

Resumen

El estudio de la viabilidad del polen es esencial para la mejora genética, ya que muestra la fertilidad de las especies. Por lo tanto, las estimaciones de los granos de polen de *B. orellana* L., en viables y no viables, son necesarios para buscar tintes eficientes, seguros y preferiblemente accesibles y fáciles de manejar para distinguir el potencial reproductivo de los gametos masculinos en el annatto El objetivo fue evaluar el potencial de cinco pruebas colorimétricas, tres reactivos sintéticos y dos reactivos alternativos, para estimar la viabilidad del polen de *B. orellana* L. Se recolectó una mezcla de 50 botones florales en la etapa previa a la antesis en diferentes lugares, en el municipio de Alta Floresta - MT. En el laboratorio, los granos de polen se analizaron con tres colorantes sintéticos: reactivo Alexander, 2% de método Lugol y Roeser (azul Astra + fucsina); Dos más naturales, extraídos de la flor de amapola roja (*Hibisco* sp.) Y de la corteza de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). La viabilidad del polen se estimó por el porcentaje de granos de polen viables y no viables. Se utilizó un diseño completamente al azar, que consta de 5 tratamientos y 10 repeticiones. Los datos se sometieron a la prueba de Tukey con una probabilidad del 5%. Los colorantes sintéticos Reactivo de alexander y Lugol 2% obtuvieron los promedios más altos, sin embargo, no difirieron en la prueba promedio del colorante alternativo de *Hibisco* sp. que demostró ser adecuado y recomendado para su uso en citogenética debido a su bajo costo, facilidad de adquisición y manejo, lo que lo convierte en una alternativa estratégica en comparación con los colorantes sintéticos convencionales.

Palabras clave: Ostra azul; Fucsina; Lugol; Alexander reactivo; Annatto.

1. Introdução

O Urucum é uma planta pertencente à família Bixaceae, originária da América Tropical, conhecido cientificamente como *B. orellana* L. (Castro et al., 2009). Considerado como um vegetal lenhoso arbustivo, perene, possui frutos encapsulados revestidos por acúleos flexíveis que apresentam diversas sementes de coloração avermelhada (Franco et al., 2002).

As plantas podem atingir uma altura de seis metros, possuem folhas verde-claras grandes, e as flores são rosadas, com muitos estames, e as sementes são classificadas como dicotiledôneas (Rohde et al., 2006).

De acordo com Mantovani et al. (2013) a pigmentação vermelha das sementes de urucum é resultado da presença de substâncias ricas em carotenóides, como a bixina e norbixina. O principal produto natural extraído do urucum é a bixina que reveste o pericarpo das sementes. Quando as cápsulas abrem, pode-se observar de trinta a cinquenta sementes por fruto, dispostas em série.

Esses pigmentos são utilizados na culinária e na indústria alimentícia como corante natural, representando um percentual de 90% dos corantes mais utilizados no Brasil, e 70% mundialmente (Mercadante & Pfander, 2001).

No caso do gênero *Bixa* que tem maior interesse na produção de grandes quantidades de sementes em decorrência a extração do corante (Castro et al., 2009). Altas taxas de viabilidade polínica são imprescindíveis, para maior produtividade de frutos.

Conhecimento inerentes a viabilidade dos grãos de pólen são necessários para estimar a fertilidade de espécies vegetais. Que por questões de irregularidades durante o processo da meiose podem ter baixa taxa de viabilidade polínica (Nascimento et al., 2014). Que interfere na produção de sementes e plantas.

Há diferentes metodologias que podem ser aplicadas na verificação da viabilidade polínica, como por exemplo, os métodos colorimétricos que fazem uso de corantes, substâncias químicas específicas que interagem com elementos celulares nos grãos de pólen maduro e permitem estimar a viabilidade de uma espécie de maneira eficiente e rápida (Techio et al., 2006; Buta et al., 2015), mas para cada espécie podem ocorrer diferentes reações de coloração entre a planta e os corantes químicos (Lauton et al., 2016).

Para tanto, na estimativa da viabilidade polínica requer observação da coloração com os diferentes corantes nos grãos de pólen. Que depende também da morfologia do gameta masculino, pois pode haver variação na espessura da exine e a intine. Objetivou-se avaliar a potencialidade de coloração de cinco testes colorimétricos, três reagentes sintéticos e dois

alternativos, com o intuito de estimar a viabilidade polínica da *B. orellana* L.

2. Metodologia

O presente estudo é uma pesquisa laboratorial e de natureza quantitativa (Pereira et al., 2018). As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, no Centro de Pesquisas e Tecnologias da Amazônia Meridional da Universidade do Estado de Mato Grosso - Brasil. Foram utilizados botões florais de *B. orellana* L. em estágio de pré-antese de três indivíduos, no município de Alta Floresta - MT (Tabela 1) que foram demarcados os locais de coleta por meio do sistema de posicionamento global (GPS).

Tabela 1. Pontos de coleta dos botões florais de *Bixa orellana* L. em pré-antese. Alta Floresta - MT, 2020.

Indivíduo	Local de coleta	Coordenadas
1	Alta Floresta – MT	9° 50' 25" Sul 56° 4' 32" Oeste
2	Alta Floresta – MT	9° 50' 25" Sul 56° 4' 34" Oeste
3	Alta Floresta – MT	9° 50' 17" Sul 56° 4' 34" Oeste

Fonte: Elaborado pelos autores (2020).

Durante as coletas foram separados 50 botões florais de cada indivíduo, e realizado uma mistura entre essas amostras. Após esse procedimento sucedeu-se a remoção das anteras conferindo então na unidade amostral para posterior preparo das lâminas.

As lâminas foram preparadas com a disposição de duas anteras sobre a face laminar, onde se acrescentou uma gota de corante. As anteras foram levemente maceradas com auxílio de um bastão de vidro para liberação dos grãos de pólen e cobertas por uma lamínula (Guerra & Souza, 2002). No total foram preparadas 10 lâminas para cada corante que compõem o tratamento.

Para estimar a viabilidade polínica foram testados cinco corantes, três sintéticos e dois alternativos: Lugol 2% (Dafni, 1992); Reagente de alexander (Alexander, 1969, 1980); o método de Roeser, composto por Azul-de-astra + Fucsina (Roeser, 1962); e os extraídos da casca de Jatobá (*H. courbaril*) (10 g de casca + 100mL de ácido acético a 2%) e da flor de

papoula vermelha (*Hibisco* sp.)(10 g + 100 mL de ácido acético a 2%) segundo Santos (2019).

Durante análise, os grãos de pólen que apresentam distribuição homogênea, exina intacta e protoplasma bem corados, foram classificados como viáveis, já os de coloração fraca, ou não corados, de tamanho anormal, ou protoplasma reduzido, foram considerados inviáveis seguindo a descrição de Gomes et. al. (2013).

Para a contagem dos grãos de pólen foi adotado o método de varredura, onde se quantificou 300 unidades polínicas por lâmina, totalizando uma amostragem de 3.000 grãos de pólen por corante. A leitura do material foi realizada com auxílio de microscópio óptico binocular Primo Star Zeiss, com objetiva de 40x.

O experimento foi conduzido através do delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 10 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e, quando significativo, o teste de Tukey foi realizado com 5%, processados através do software estatístico GENES (Cruz, 2008).

3. Resultados e Discussão

Por meio dos testes colorimétricos é possível obter informações sobre os grãos de pólen que auxiliam nos estudos relacionados a fertilidade do gameta masculino, contribuindo para seleção de materiais. Ao observar os dados relativos da análise de variância, pode-se destacar que ocorre variabilidade entre os corantes analisados, pois houve diferenças estatísticas entre suas médias (Tabela 2).

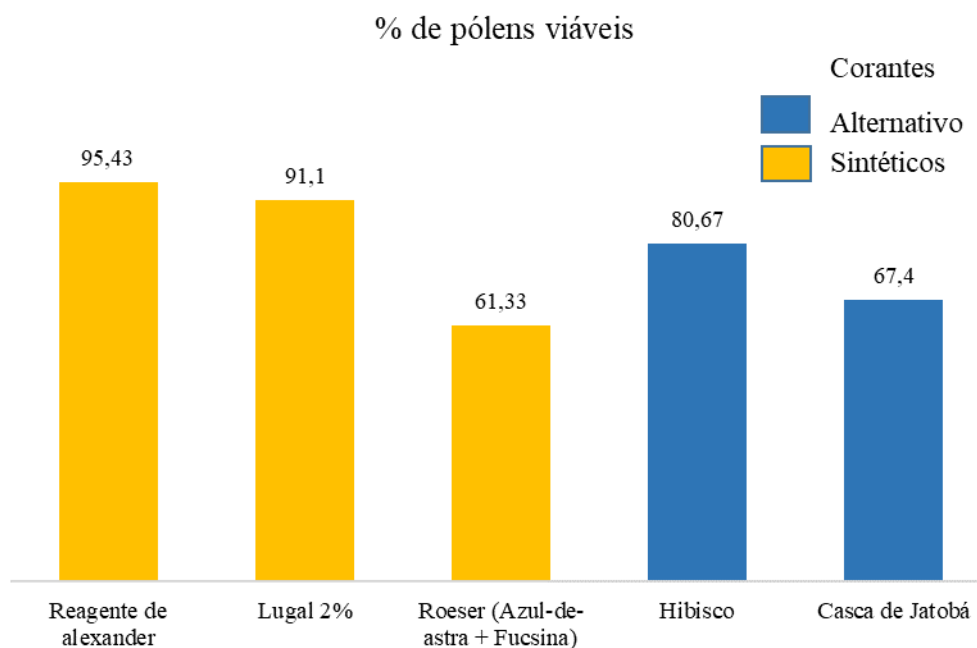
Tabela 2. Estimativa média de pólen viáveis para a espécie *Bixa orellana* L. com os corantes Reagente de alexander, Lugol, Roeser (Azul-de-astra + Fucsina), Hibisco, e Casca de Jatobá. Alta Floresta - MT, 2020.

Corantes	Viabilidade polínica (%)
Reagente de alexander	95,43 a
Lugol 1%	91,10 ab
Roeser (Azul-de-astra + Fucsina)	61,33 c
Casca de Jatobá	67,40 bc
Hibisco	80,67 abc
Valor de F	5,46**
CV (%)	25,13

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey 1% de probabilidade. - Fonte: Elaborado pelos autores (2020).

Com a obtenção das médias relativas à porcentagem de pólen viáveis de cada corante verificou-se que, a comparação entre os grupos de corantes sintéticos Reagente de alexander e Lugol 2%, com o alternativo da solução de hibisco, não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 2), e foram obtidas taxas de viabilidade acima de 80% (Figura 1), que segundo Souza et al., (2002) para programas de melhoramento vegetal a viabilidade polínica deve estar acima de 70%. Desta forma, o uso destes três corante permitiu o diagnóstico dos grãos de pólen viáveis dos inviáveis com segurança.

Figura 1. Percentual médio de pólen viáveis para a espécie *Bixa orellana* L. com os corantes alternativos (Casca de jatobá e Hibisco) e corantes sintéticos (Reagente de alexander, Lugol 2%, e Roeser (Azul-de-astra + Fucsina)). Alta Floresta - MT, 2020.



Fonte: Elaborado pelos autores (2020).

De modo geral, no que tange a viabilidade polínica, a literatura destaca que o Reagente de alexander se sobressai quando comparado a outros corantes por apresentar uma melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis (Kuhn, 2015). O Reagente de alexander é uma solução tripla composta por fucsina básica, que cora o citoplasma de vermelho, o Verde malaquita, colore de verde a parede do grão de pólen, e o Orange G, é um intensificador de coloração (Alexander, 1969; Braga et al., 2019). Na Figura 1A, o grão de pólen viável apresenta a coloração verde na exine e rosa púrpura no protoplasma e o pólen inviável apenas a coloração verde por não apresentar protoplasma (Figura.1B).

Os grãos de pólen viáveis corados com Lugol 2% (Figura 1 C), apresentaram coloração marrom com presença de protoplasma. A reação entre o iodo e as moléculas de amido dão aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom e os inviáveis, pela ausência do amido, tornam-se amarelo-claro, meio transparentes (Dafni, 1992; Santos Neto et al., 2006; Munhoz et. al., 2008). Este corante pode ser utilizado para estimativa da viabilidade, pois permite distinguir de forma clara os grãos de pólen viáveis dos inviáveis.

Os grãos de pólen obtidos pela coloração de Roeser (Figura 1 E e F) foram difíceis se serem distintos pela coloração do referido corante, pois nesta espécie os inviáveis

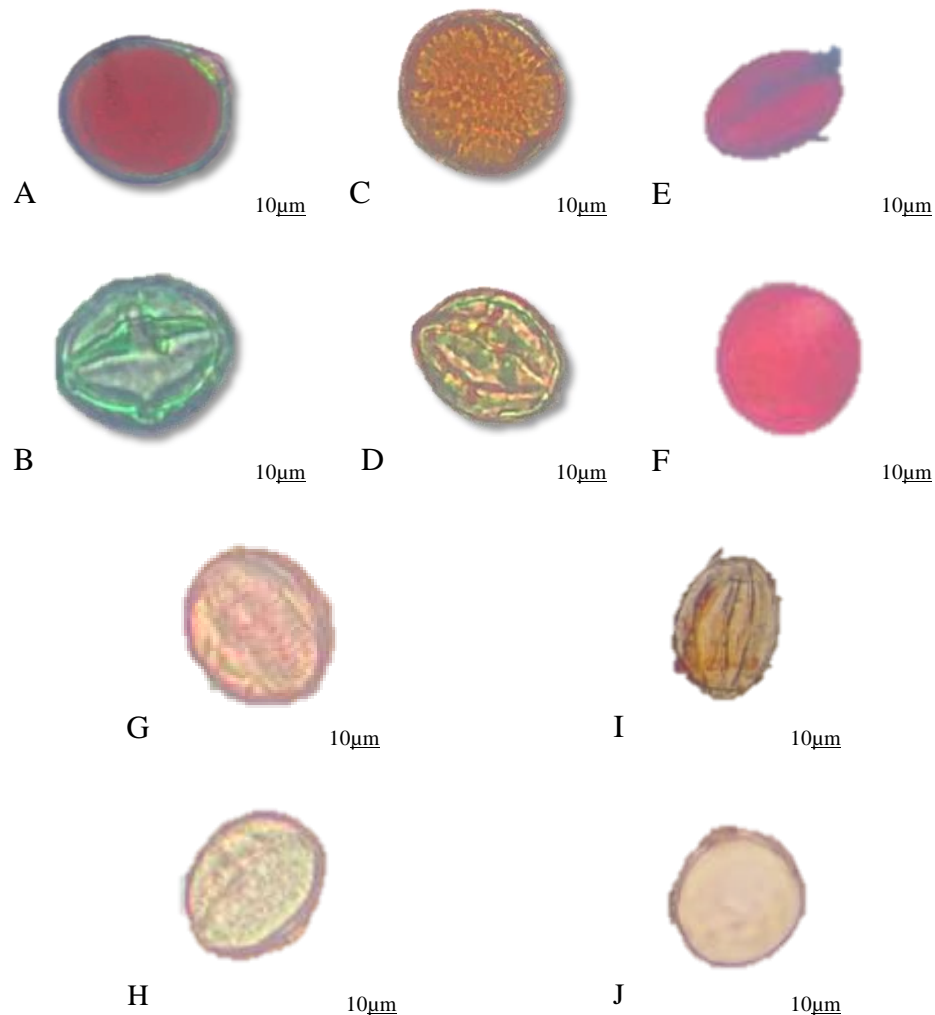
apresentaram coloração menos intensa em relação aos grãos de pólen viáveis. Para tanto este corante não é recomendado para esta espécie. No método de Roeser, o Azul-de-Astra ressalta as fibras celulósicas e a parte de lignina da parede celular com tons azulados, enquanto, a fucsina destaca a presença de parede celular, corando de vermelho estruturas lignificadas, cutinizada ou suberizadas (Luque et. al. 1972; Cortez et. al. 2016).

Entre os corantes naturais utilizados, destacou-se o extraído de hibisco que corou 80,67% dos grãos de pólen, classificados viáveis. A coloração dos grãos de pólen com a solução alternativa, foi observada que os grãos de pólen viáveis obtiveram uma coloração rosa avermelhada por conta da reação das antocianinas no hibisco que reagem com o protoplasma presentes nos polens viáveis (Figura 1 G). De acordo Santos (2019) o corante alternativo de hibisco permitiu distinção com segurança nos grãos polens de *Tabebuia pentaphilla*. Este corante além de baixo custo permite obter resultados relevantes em relação aos corantes sintéticos.

Por meio da solução da casca do jatobá, foram visualizados grãos de pólen viáveis (Figura 1 I) com a coloração marrom- amarelado devido a reação 4,6-di (1,1 - dimetiletil)-2-metil fenol presente na casca do jatobá (Menezes Filho et al., 2019) com o protoplasma do grão de pólen (Santos, 2019). Para a espécie em questão foi possível com uma certa dificuldade diferenciar os grãos de pólen viáveis dos inviáveis (Figura 1H), isso pode estar associado ainda a espessura da exine do pólen, que dependendo pode dificultar o acesso do corante até o protoplasma. Como é o caso dos grãos de pólen do gênero *Passiflora* (Santos et al., 2016).

Os corantes alternativos extraídos de compostos naturais são antocianinas, notadamente a cianidin-3-glucosídeo, pigmentos glicolisados, iônicos e hidrossolúveis que, na forma de cátions, conferem variações da cor vermelha, roxo e azul às células vegetais (Khoo et. al. 2017). Para Silva et. al. (2016) o extrato aquoso *Hibiscus rosa-sinensis* L., na forma de chá, contém 193,69mg/100g de antocianinas.

Figura 2. Grãos de pólen de *Bixa orellana* L. corados com: Reagente de alexander – (A) Viável, (B) Inviável; Lugol 2% - (C) Viável, (D) Inviável; Roeser (Azul-de-astra + Fucsina) – (E) Viável, (F) Inviável; Hibisco – (G) Viável, (H) Inviável; Casca de jatobá – (I) Viável, (J) Inviável. Barra = 10µm. Alta Floresta - MT, 2020.



Fonte: Elaborado pelos autores (2020).

A viabilidade polínica pode ser estimada de diversas formas, porém, devido à facilidade de aplicação tornou-se recorrente o uso dos corantes sintéticos que reagem de forma satisfatória com os pólenes maduros e permitem bons resultados (Hister & Tedesco, 2016).

Além disso, para determinação do corante a ser empregado nos experimentos deve ser levada em consideração a facilidade da identificação das estruturas da célula polínica para classificação dos grãos de pólenes viáveis e inviáveis (Frescura et al., 2012). Com isso, os testes realizados com diferentes corantes são considerados procedimentos indicados para o

alcance de resultados seguros e satisfatórios (Soares et al., 2019)

A utilização do corante alternativo de hibisco se mostrou viável para análise citogenética de viabilidade polínica, pois apresentou médias próximas dos reagentes sintéticos de Alexander e Lugol 2%, que obtiveram os melhores resultados. Portanto, o corante extraído da papoula vermelha (*Hibisco* sp.) se sobressai de forma estratégica por ser composto natural, de baixo custo, fácil aquisição e manipulação, como também pode favorecer no trabalho de pessoas com reações alérgicas aos corantes sintéticos.

4. Considerações Finais

Por meio da análise da viabilidade polínica da *B. orellana* L. estimada através de cinco métodos colorimétricos, foi possível verificar que o material em questão apresenta alta taxa de viabilidade considerando referências na literatura.

Entre os corantes sintéticos, Reagente de alexander obteve maior taxa de viabilidade polínica, mais recomendamos o uso do lugol 2% por demonstrar eficiência, e ser um reagente de maior acessibilidade.

Em relação aos corantes alternativos, o maior êxito foi verificado por meio da solução de hibisco, por apresentar nítida distinção entre os grãos de pólen. O uso de corantes alternativos se faz necessário, tanto por questões econômicas e preservação do meio ambiente pela redução manuseio de soluções nocivas.

Agradecimentos

À Universidade Estadual do Mato Grosso (UNEMAT), e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Alexander, M. P. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*, 44(3), 117-22.

Alexander, M. P. (1980). Versatile stain for pollen fungi yeast and bacteria. *Stain technology*, *Baltimore*, 55(1),13-8.

- Braga, C. S., Zanetti, G. T., Lima, J. S., Oliveira, C. A. C., Karsburg, I. V. (2018). Comportamento meiótico e viabilidade polínica de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) por meio de testes colorimétricos. *Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer*, 5(9):478-486.
- Buta, E., Cantor, M., Ștefan, R., Pop, R., Mitre, I., Buta, M., & Sestraș, R. E. (2015). FT-IR characterization of pollen biochemistry, viability, and germination capacity in *Saintpaulia* H Wendl genotypes. *Journal of Spectroscopy*, 2015(s/n):1-7.
- Castro, C. B., Martins, C. S., Falesi, I. C., Nazare, R. F. R., Kato, O. H., Benchimol, R. L., Venturieri, M. (2009). *A Cultura do Urucum*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 61p.
- Cortez, P. A., Silva, D. C., Chaves, A. L. F. (2016). *Manual prático de morfologia e anatomia vegetal*. Ilheus, BA: Edithus, 2016. 92p.
- Cruz, C. D. (2008). *Programa Genes - Diversidade Genética*. 1.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 1, 278 p.
- Dafni, A. (1992). *Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)*. New York, Oxford: University press, 250 p.
- Franco, C. F. O., Silva, F. C., Filho, J. C., Neto, M. B., São José, A. R., Rebouças, T. N. H., Fontinelli, I. E. C. (2002). *Urucuzeiro agronegócios de corantes naturais*. João Pessoa: EMEPA-PB, 120 p.
- Frescura, V. D., Laughinghouse, I. V. H. D., Cantodorow, T. S., Tedesco, S. B. (2012). Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. *Biocell*, 36(3):143-145.
- Gomes, N., Sousa, R., Nascimento, J., Silva, N., Coelho, A. (2013). Identificação e Extração de Antocianinas. In: *Congresso brasileiro de química - Química ampliando as fronteiras*, 53°. Rio de Janeiro/RJ. ISBN: 978-85-85905-06-4.
- Guerra, M., Souza, M. D. (2002). *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto: FUNPEC, 201.

Hister, C. A. L., Tedesco, S. B. (2016). Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 18(1):135-141.

Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1):1361779. Doi:10.1080/16546628.2017.1361779.

Kuhn, A. W. (2015). Viabilidade polínica, genotoxicidade, efeito antiproliferativo e compostos fenólicos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (Lamiaceae). 2015. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Lauton, D. S., Santos, A. C., Karsburg, I. V., Damasio, J. F. (2016); Viabilidade polínica de jasmim manga com corante tetrazólio. *Ciência & Tecnologia: Fatec-JB*, 8(1):8-14.

Luque, R., Sousa, H. C., Kraus, J. E. (1996). Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado - e Kropp (1972) visando a substituição do azul-de-astra por azul de alcião 8GS ou 8GX. *Acta Botânica Brasileira*, 10(2).

Nascimento, L. S., Benevenuti, A. S., Leite, D. M., Silva, D. D., Moura, E. A., Miranda, D., Karsburg, I. V. (2014). Estimativa da Viabilidade Polínica e Índice Meiótico de "Delonix Regia". *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, 41(esp.):83-88.

Mantovani, N. C., Grando, M. F., Xavier, A., Otoni, W. C. (2013). Avaliação de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.). Por meio de caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. *Ciência Florestal*, 23(2):355-362.

Menezes Filho, A. C. P., Malaquias, K. S., Castro, C. F. S. (2019). Caracterização dos compostos químicos dos óleos extraídos da casca, arilo e semente dos frutos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Jatobá--do--Cerrado). *Ensaio e Ciências*, 23(2):195--198.

Mercadante, A. Z., Pfander, H. (2001). Caracterização de um novo carotenoide minoritário de urucum. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(2):193-196.

Munhoz, M., Luz, C. F. P., Meissner Filho, P. E., Barth, O. M., Reinert, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Revista Brasileira de Botânica*, 31(2):209-214.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., Shitsuka, R (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFMS. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Roeser, K. R. (1972). Die Nadei der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos* 61: 33-36

Rohde, D. C., Silveira, S. O., Vargas, V. R. A. (2006). O uso do corante urucum (*Bixa orellana* L.) na técnica de coloração histológica. *RBAC*, 38(2):119-121.

Santos, A. L. (2019). Coloração de grãos de pólen de *Tabebuia pentaphylla* (linnaeus) Hemsley com uso de soluções obtidas de produtos alternativos. Trabalho de Conclusão de Cursos – Ciências Biológicas – Universidade do Estado de Mato Grosso. 56p.

Santos, L. C. B., Fernandes, L., Macedo, W. A., Santos, B. N. V., Leite, D. M., Karsburg, I. V., Praça-Fonte, M. M. (2016). Uso de cloreto de trifeniltetrazólio parateste de viabilidade polínica de maracujazeiro doce. *Ciência & Tecnologia: Fatec-JB*, 8(1):22-28.

Santos Neto, O., Karsburg, I. S., yoshitome, M. Y, (2006). Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*solanum paniculatum* L.). *Revista de Ciências Agro-Ambientais*, 4(1):67-74.

Silva, A. B., Wiest, J. M., Carvalho, H. H. C. (2016). Compostos químicos e atividade antioxidante analisados em *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria). *Brazilian Journal of Food Technology*, 19(s/n):1-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.7415>

Soares, J. A. G., Faria, H. C. B., Karsburg, I. V. (2019). Estudo da viabilidade polínica de *Dypsis lutescens*: Por meio de diferentes métodos colorimétricos. *Revista eletrônica de iniciação científica*, 5(s/n):10-18.

Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Martins, E. R. (2002). Microsporogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa Degener*). *Ciência e Agrotecnologia*, 26(6),1209-1217.

Techio, V. H., Davide, L. C., Pedrozo, C. A., Pereira, A. V. (2006). Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28(1),7-12.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Thatielen Furini – 14,29%

Maicon de Souza Pecegueiro – 14,29%

Fernando Herrmann – 14,29%

Jean Carlos Silva – 14,29%

Joelson de Oliveira Barros – 14,29%

Samiele Camargo de Oliveira Domingues – 14,29%

Isane Vera Karsburg – 14,29%